

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

研究課題：漢方薬によるメタボリック症候群の病態基盤「自然炎症」の制御

研究代表者 丸山 征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究要旨

メタボリック症候群（糖尿病、高脂血症など）の病態基盤には“自然炎症”が存在し、これがマイルドであるが、持続、遷延して、結果として不可逆的な臓器障害（慢性腎炎、動脈硬化・血栓症など）を引き起こすことが判明してきた。この自然炎症は古典的ないわゆる“紅腫熱疼”、緊急性機能障害を伴わないが、最終的には臓器機能廃絶、そして silent killer として働くため、今後の治療上の大きな標的となっている。しかし原疾患のコントロールによる間接的な方法しか存在しないのが現状である。

そこで本研究では、漢方薬を自然炎症制御の一方策として確立することを目的として、代表的漢方薬、生薬の効果の評価、検証とその作用メカニズムについて検討した。

研究の結果、漢方薬を構成する生薬の中に、抗酸化、酸素ラディカル制御、DAMPs の代表である HMGB1 の産生放出を抑制し、メタボリック症候群の治療に有望な処方が存在しうることを証明し得た。

研究分担者 丸山 征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任教授
研究分担者 伊藤 隆史 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任講師
研究分担者 川原 幸一 大阪工業大学生命工学科・教授
研究分担者 橋口 照人 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授
研究分担者 大山 陽子 鹿児島大学医学部歯学部附属病院検査部・特任助教

A．研究目的

目的:メタボリック症候群の病態の基盤である“自然炎症”の治療に漢方薬が有効な一手段となることを検証する。

1)漢方薬のなかで、炎症性疾患に使われている薬方を選び、それが実験的炎症に有効であるか、否かを調べた。炎症モデルとしては、アデニン経口摂取による実験的腎炎をラットに作製して、五苓散とその構成生薬を投与して、生化学的、病理学的に効果を判定した(大山、丸山ら)。

2)研究の過程で、遠志(オンジ、加味帰脾湯、帰脾湯、人參養榮湯などに含有)のなかに、1,5-anhydrofructose, 以下 1、5 - AF)が含まれており、これが抗炎症活性を持つことを突き止めたので、その抗炎症活性のメカニズムにつ

いて検討した(丸山ら、伊藤ら、川原ら)。

3)自然炎症には HMGB1 が重要な役割を果たすことは申請者ら、他の国内外の研究者らによって報告されている。そこで本研究では、HMGB1 の発現、細胞外遊離に対する生薬やその成分の効果を *in vivo*, *in vitro* で検討した(大山、伊藤、丸山ら)。

4)炎症、特に自然炎症と糖尿病の関係について、特に血管新生、糖代謝、糖尿病との面から研究した(橋口ら)。

(倫理面への配慮)

すべて大学の倫理委員会の認可のもとに研究を実施した。

B．研究方法

1. 生薬、食品中の抗自然炎症活性の検証

1) 精製 1,5-AF (生薬: 遠志中に含まれている) の抗炎症活性を培養細胞とマウスを使った実験で行った。

in vitro 試験: 培養ラット腹腔マクロファージを各種濃度の 1,5-AF 存在下で、エンドトキシン (LPS) と ATP, あるいはその他の DAMPs/PAMPs で刺激し、上清中の IL-1, TNF, HMGB1 を ELISA で測定した。

in vivo 実験: LPS 腹腔内投与前後で、1,5-AF を同じく腹腔内投与して生存率を調べた。

2) 1,5-AF の抗炎症活性の作用メカニズムの解析: 1,5-AF に抗炎症活性を in vitro, in vivo 双方で認めたので、その分子機序を明らかにする目的で、免疫プロット法でインフラマソームの挙動を解析した。

2. 食品中の自然炎症惹起分子の同定とその炎症惹起の分子細胞機構

1) 各種日本産イチゴの素分画、HPLC で高度に分画した成分について、その血小板活性化抑制作用を調べた。

2) 食品によるメタボリック症候群の発症機構を明らかにする目的で、パルミチン酸の pro-inflammatory, pro-coagulant 活性とその分子細胞機構について解析した。

3. 実験的腎炎

アデニン混入させた食餌を摂食させて、同時に五苓散をも経口投与して五苓散の効果を生化学的(尿、血液)、腎組織病態学的に評価した。病理組織的解析としては HMGB1 の沈着とその酸化還元状態をウエスタンプロットで解析した。

C. 研究結果

1) アデニン投与慢性腎炎に対する五苓散の効果

五苓散には実験的腎炎を生化学的、組織学的に軽減させる活性が観察された。すなわち組織学血中の HMGB1 濃度、酸素ラジカル濃度の低下などである。また組織学的にも腎臓における HMGB1 の発現、沈着を抑制する傾向が観察された。In vitro の実験でも五苓散(とその構成生薬、澤瀉、茯苓など)は樹状細胞、マクロファージにおける HMGB1 の発現、細胞外遊離を抑制した。

2) 1,5-AF は in vitro のみならず、in vivo においても抗炎症的に作用した。その抗炎症性活性は、HMGB1 発現と細胞外へ遊離の抑制、TNF, IL-1, IL-18 の産生の抑制であることが明らかとなった。そしてその分子メカニズムは、PRRs(pattern recognition receptors)-インフラマソーム活性化の抑制を介するものであった。

D. 考察

「メタボリック症候群の病態の基盤は自然炎症であるという概念」の確立は最近のトピックスであり、この自然炎症を標的とした治療法の開発が望まれている。しかしながら、従来の古典的炎症の治療薬である抗炎症療法すなわち、PG 制御剤、炎症性サイトカインを標的とした治療法(生物学的製剤やアンタゴニストなど)は、投与方法(多くは注射薬であること)的に煩雑であること、高価であること、そしてなによりも自然炎症という慢性的な炎症には効果が限定的であり、逆に副作用が出やすいこと、などの理由で、より自然炎症の制御に標的が合った治療法の開発が望まれている。これらの現状を踏まえ、申請者らは漢方薬に着目して今回の研究を展開した。

結果、五苓散が実験的腎炎モデルラットに一定の効果を示すこと、その分子細胞基盤に、HMGB1 の細胞外放出の抑制や酸素ラジカルの発生抑制があることをつきとめた。

さらし生薬: 遠志の中には 1,5-AF という単糖が含まれており、これが幅広く炎症を抑制すること、それは IL-1, IL-18, TNF, HMGB1 の産生抑制など炎症性サイトカインの産生と細胞外分泌の抑制によることを明らかにしえた。

そしてこれらの炎症性サイトカイン産生・放出抑制の機序、すなわち 1,5-AF の標的分子も明らかにしえた。その分子細胞基盤に炎症の中核である PRRs(Pattern recognition receptors) から下流のシグナル伝達経路の抑制であることを証明し得た。

E. 結論

メタボリック症候群の病理基盤である“自然炎症”に対しては、現在のところ、この自然炎症そのものを標的とした有力な治療法は無い状態であるが、今回の研究で、漢方薬やその構成成分の生薬のある種のものが、有効であることを基礎的研究ないし、動物実験により明らか

にすることが出来た。残された問題は患者を対象とした臨床研究でのエビデンスであるが、今後これを「医師主導型」治験などで検証してゆくことが課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shrestha C, Ito T, Kawahara KI, Shrestha B, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Maruyama I: Saturated fatty acid palmitate induces extracellular release of histone H3: A possible mechanistic basis for high-fat diet-induced inflammation and thrombosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 437, 573-578, 2013.

Sarikaphuti A, Nararatwanchai T, Hashiguchi T, Ito T, Thaworanunta S, Kikuchi K, Oyama Y, Maruyama I, Tancharoen S: Preventive effects of *Morus alba* L. anthocyanins on diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Exp Ther Med*, 6, 689-695, 2013.

丸山 征郎「炎症のトポロジーへの血球関与のスペクトラム」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患、丸山 征郎 編集、北隆館、9-13 頁、2013 年

伊藤 隆史「PAMPs /DAMPs のセンサー細胞としてのマクロファージ・樹状細胞」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患、丸山 征郎 編集、北隆館、84-89 頁、2013 年

Takenouchi K, Shrestha B, Yamakuchi M, Yoshinaga N, Arimura N, Kawaguchi H, Nagasato T, Feil R, Kawahara KI, Sakamoto T, Maruyama I, Hashiguchi T: Upregulation of non-Cell-derived Vascular Endothelial Growth Factor A Increases Small Clusters of Insulin producing Cells in the Pancreas. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2014. in press

伊藤 隆史「メタボリックストレスと自然炎症」*Thrombosis Medicine*、第 4 巻、第 2 号、52-55 頁、2014 年

丸山 征郎「東洋医学における血管観」*血管医学*、第 15 巻、第 1 号、87-91 頁、2014 年

丸山 征郎「生体のシステムから観た漢方の有効性とその作用機序」*日本東洋医学会専門医会誌 (DVD)*、2014 年

丸山 征郎「より大いなるヒトの生存の原理と戦略を俯瞰する - 漢方薬の論理と効果 -」*Kampo Square*、2014 年 印刷中

2. 学会発表

伊藤 隆史、第 36 回 日本血栓止血学会学術集会にて発表予定(平成 26 年 5 月 29 ~ 31 日)

大山 陽子、第 65 回 日本東洋医学会学術集会総会にて発表予定(平成 26 年 6 月 27 ~ 29 日)

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

1, 5 - AF の抗炎症性に関しては国内、国外出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし